

CREKA/tTF 融合蛋白表达及活性鉴定

苏毅^{1,2}, 颜江华¹, 王生育¹, 何杰^{1,2}, 叶民^{1,2}

(厦门大学 1. 医学院 抗癌研究中心, 2. 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 制备用于靶向肿瘤血管中的凝血血浆蛋白的 CREKA/tTF 融合蛋白,并鉴定其生物学活性。方法 利用 PCR 技术构建 CREKA 与 tTF 的融合基因,克隆至表达载体 pET22b(+),在 *E. coli* BL21 中表达,镍亲和色谱柱纯化,梯度透析复性。利用凝血时间,结合荧光定量测定等实验在体外鉴定该融合蛋白的活性。结果 获得序列正确的 CREKA/tTF/pET22b(+)重组子,融合蛋白在 *E. coli* BL21 中高效表达。纯化后的融合蛋白具有引起血液凝固的功能,且能与凝血血浆蛋白结合。结论 成功构建 CREKA/tTF/pET22b(+)重组子,CREKA/tTF 融合蛋白具有 TF 凝血活性及 CREKA 的结合活性。

关键词: CREKA; tTF; 肿瘤; 血管靶向; 融合蛋白

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2010)02-0094-04

Expression and activities analysis of a fusion protein CREKA/tTF

SU Yi^{1,2}, YAN Jiang-hua¹, WANG Sheng-yu¹, HE Jie^{1,2}, YE Min^{1,2}

(1. Cancer Research Center of Medical College, 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: **Purpose** To prepare a novel fusion protein of CREKA and tTF as a universal carrier targeting to cancer, and to analyze its activities. **Methods** CREKA and tTF gene were acquired by PCR, and inserted into plasmid pET22b(+) to construct recombinant plasmid CREKA/tTF/pET22b(+), and the fusion gene was expressed in *E. coli* BL21. The fusion protein was purified through Nickel-affinity chromatography column. After purifying, the fusion protein was refold by subsequent dialysis. The activities of the fusion proteins were measured by coagulation timing and quantitative fluorescence test *in vitro*. **Results** The recombinant plasmid CREKA/tTF/pET22b(+) with correct sequence was obtained. The fusion protein was highly expressed in *E. coli* BL21. The coagulation of the fusion protein was determined by the coagulation test. And the capability of the fusion protein effectively binding to clotted plasma proteins is identified in quantitative fluorescence test. **Conclusion** The recombinant plasmid CREKA/tTF/pET22b(+) with correct sequence was built. The fusion protein CREKA/tTF with both TF and CREKA activity was successfully obtained.

Key words: CREKA; tTF; tumor; target of vasculature; fusion protein

在肿瘤生长、发展、转移过程中,肿瘤血管系统占有重要的地位。有研究表明对小鼠肿瘤血管的物理性栓塞可导致肿瘤衰退^[1]。利用靶向性血栓药物实现对实体瘤血管的选择性栓塞是一种新颖的抗肿瘤策略。Thorpe 实验室^[2]首次构建了抗肿瘤血管标志物 MHCII 的抗体与截短的组织因子 tTF(truncated

Tissue Factor,即外源性凝血始发因子的胞外区)的融合蛋白,在小鼠体内诱发肿瘤组织血管栓塞,导致肿瘤衰退。之后,许多研究者分别用不同的靶向载体将 tTF 靶向至肿瘤血管,在治疗小鼠实体瘤上均取得明显的抗肿瘤效果^[3-5]。将截短的组织因子 tTF 的潜在凝血功能,与肿瘤血管靶向载体的靶向传递相结合,可实现选择性诱发肿瘤组织血管血栓栓塞、阻断肿瘤营养物质和氧气的供给,引发肿瘤缺血性坏死,从而达到抗肿瘤作用。

在实体瘤中,肿瘤血管与正常血管,无论在功能上还是行态学上均存在特征性的差异^[6]。例如肿瘤

收稿日期: 2009-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30973485); 厦门大学科技创新项目(XDKJ CX20053026)

作者简介: 苏毅(1983-),男,福建人,硕士; 颜江华(1963-),男,通信作者,副教授, Tel: 0592-2180587, E-mail: jhyan@xmu.edu.cn.

血管中出现有不同程度的血凝激活现象而表现为所谓的“高凝状态”或“低级别的弥散性血管内凝血(DIC)”。这种病理性特征差异为新药设计和治疗策略的高度选择性提供了独特的靶点,凝血血浆蛋白便是其中的一个潜在靶点。Simberg 等^[7]利用体内肽库^[8]筛选鉴别出了一个五肽,发现它能与肿瘤血管中的凝血血浆蛋白结合,进而定位在肿瘤血管中。这个五肽就是 Cys-Arg-Glu-Lys-Ala (CREKA)^[7]。基于 CREKA 能够选择性靶向至肿瘤血管的特性,我们首次利用这一短肽作为肿瘤血管靶向载体,构建 CREKA 与 tTF 的融合蛋白,探讨其介导 tTF 的选择性血栓栓塞作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 BL21 (DE3) 由厦门大学医学院抗癌研究中心保藏;质粒 pET22b (+) 购自 Novagen 公司;质粒 tTF/pET22b (+), 自行构建。

1.1.2 工具酶及试剂 工具酶购自 NEB 公司;DNA 纯化试剂盒为 OMEGA 公司产品;DNA 序列分析由上海英骏公司完成;Ni²⁺-HiTrap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品;异硫氰酸罗丹明 B (RBITC) 荧光染料为 Biochemika 公司产品。

1.1.3 融合蛋白基因设计与引物合成 融合基因结构为 (CREKA)₃-G₄S-tTF。引物均由上海生工合成。根据质粒 tTF/pET22b (+) cDNA 序列设计扩增 tTF 的引物: P1: 5'-TCTGGCACTACAAATAC-3' 和 P2: 5'-CCGCTCGAGTCTCTGAATTC-3'。设计 P3 引入 (CREKA)₃-G₄S 基因。P3: 5'-CCATGGGCTGCCGCGAGAAA GCGTGTCGTGAGAAA GCCTGTCGGGAGAAA GCGCGGTGGTGGCTCTTCTGCCACTACAAATAC-3'。设计 P4 与 P2 联合用于 (CREKA)₃-G₄S-tTF 基因扩增并引入引入 *Nco* 和 *Xho* 酶切位点。P4: 5'-CATGCCATGGGCTGCCGC-3'。

1.2 方法

1.2.1 融合基因 (CREKA)₃-tTF 的构建 以 tTF/pET22 为模板, P1 和 P2 为引物, 常规 PCR 扩增 tTF 基因: 94 °C, 4 min (94 °C 变性 30 s 55 °C 退火 45 s 72 °C 延伸 1 min) 循环 30 次, 72 °C 延伸 10 min。纯化回收扩增片段。将 P3 与扩增片段退火融合得到 (CREKA)₃-tTF 模板, 94 °C, 4 min (94 °C 变性 30 s 72 °C 延伸 1 min) 循环 35 次, 72 °C 延伸 10 min。产物纯化回收得 (CREKA)₃-tTF 模板。以引物 P2、P4 扩增 (CREKA)₃-tTF 融合基因, 同时加入酶切位点: 94 °C, 4 min (94 °C 变性 30 s 55 °C 退火 45 s 72 °C

延伸 1 min) 循环 30 次, 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶鉴定、胶回收纯化目的片段。

1.2.2 重组质粒的构建及转化 将纯化的 (CREKA)₃-tTF 产物及载体 pET22b (+) 分别用 *Nco* 和 *Xho* 进行双酶切, 胶分离纯化回收, T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* BL21, 以氨苄西林抗性初筛, 挑单克隆用 pET22b (+) 通用引物及 P2、P4 分别进行菌液 PCR 筛选, 同时做 *Nco* 和 *Xho* 进行双酶切检验, 阳性克隆送上海英骏公司测序。

1.2.3 融合蛋白的表达纯化及复性 挑含正确重组质粒 (CREKA)₃-tTF-pET22b (+) 的单菌落 37 °C 培养过夜, 少量诱导表达 SDS-PAGE 检测正确后, 按 1:100 稀释, 扩大培养, 通过不同的诱导时间和 IPTG 浓度优化其表达条件。在扩大培养至 A₆₀₀ 为 0.4~0.6 时加 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L 诱导表达 6 h。由于 pET22b (+) 表达的融合蛋白 C 端带有 6 × His 标签, 目的蛋白纯化方案参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的镍柱蛋白纯化操作手册。纯化后的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析鉴定, 并采用磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析复性。

1.2.4 融合蛋白凝血实验 参照 Scholz 等^[9]凝血实验方法, 在室温下记录从加入 CaCl₂ 至血浆开始出现不流动的时间。

1.2.5 融合蛋白荧光标记 将融合蛋白在 pH 9.0~9.5 碳酸盐缓冲液透析过夜, 按每 1 mg 蛋白加荧光素 0.01 mg, 边搅拌边将含有 1 mg/mL 荧光素的二甲亚砜 (DMSO), 搅拌均匀, 置 4 °C 冰箱中反应过夜。再用 PBS (pH 7.4) 透析, 以除去游离荧光素。

1.2.6 融合蛋白荧光定量测定 将凝血标本固定, 以 PBS 液洗 3 次, 然后加入荧光标记的融合蛋白, 再以 PBS 液洗 3 次后加甘油缓冲液, 最后封片、镜检、拍照。利用 Scion image 软件对照片进行 IOD (integrated optical density) 分析。

2 结果

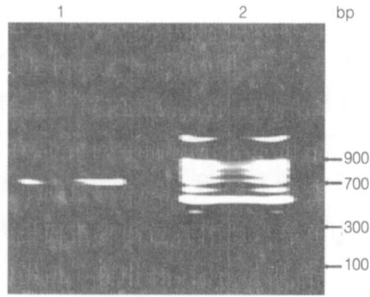
2.1 (CREKA)₃-tTF 的 PCR 扩增

PCR 扩增 (CREKA)₃-tTF 经 PCR 扩增获得 (CREKA)₃-tTF 产物, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 700 bp 左右处见单一条带 (图 1), 其大小与理论计算值 (739 bp) 基本一致。

2.2 重组质粒的鉴定

氨苄西林抗性初筛, 提取重组质粒并用 *Nco* 和 *Xho* 双酶切, 得到约 700 bp 的条带 (图 2), 与融合基因 (CREKA)₃-tTF 的大小基本相符。再将阳性

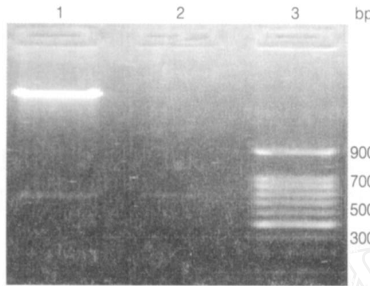
克隆送上海英骏公司测序,结果经核苷酸序列和蛋白编码分析与我们设计的结果完全一致,即为正确的重组质粒。



1. (CREKA)₃-tTF PCR 产物; 2. DNA M_r 标记
1. (CREKA)₃-tTF (about 700 bp); 2. DNA marker

图 1 (CREKA)₃-tTF 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Analysis of PCR product of (CREKA)₃-tTF gene by agarose gel electrophoresis



1. Nco I 和 Xho I 双酶切 (CREKA)₃-tTF; 2. (CREKA)₃-tTF PCR 产物; 3. DNA M_r 标记
1. The fragments of CREKA/tTF/pET22b (+) cut by Nco I and Xho I; 2. PCR product of (CREKA)₃-tTF; 3. DNA marker

图 2 (CREKA)₃-tTF 基因重组质粒的双酶切鉴定

Fig.2 Recombinant plasmid with (CREKA)₃-tTF gene was identified by cutting of Nco I and Xho I

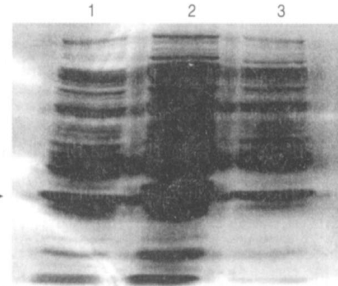
2.3 融合基因 (CREKA)₃-tTF 在 E. coli BL21 (DE3) 中的表达

含有 CREKA/tTF/pET22b (+) 的 E. coli BL21 经过 IPTG 诱导后,明显表达了一种新的蛋白(图 3,箭头所指)。未加 IPTG 的含有 (CREKA)₃-tTF/pET22b (+) 的 E. coli BL21 相对于未含有外源基因 pET22b (+) 的 E. coli BL21 (DE3) 多表达 1 条带,而这条带在加 IPTG 的含有 (CREKA)₃-tTF/pET22b (+) 的 E. coli BL21 中明显高表达。通过一系列诱导剂浓度诱导表达测试,发现 IPTG 浓度终浓度达到 0.2 mmol/L 时蛋白表达量最佳(图 4)。

2.4 融合蛋白 (CREKA)₃-tTF 的纯化及复性

经 SDS-PAGE 分析显示含重组子 E. coli BL21 在相对分子质量 (M_r) 约 35 000 处有蛋白高表达,并发现目的蛋白主要以包含体形式存在,在上清中也含有目的蛋白。利用 His 标签过镍亲和色谱柱纯化

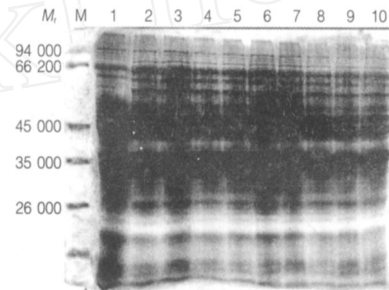
后,纯化样品仅在 M_r 35 000 左右处有单一的条带,纯化蛋白的 M_r 偏大,这与 tTF 构型有关。纯化产物在进行复性后, M_r 大小与 (CREKA)₃-tTF-pET22b (+) 的 E. coli BL21 高表达蛋白一致(见图 5)。



1. 未加 IPTG 的含重组子 E. coli BL21 的表达; 2. 使用 IPTG 诱导含重组子 E. coli BL21 的表达; 3. 未含有重组子 E. coli BL21 的表达
1. Expression of (CREKA)₃-tTF fusion protein without IPTG; 2. Expression of (CREKA)₃-tTF fusion protein with IPTG; 3. Expression without (CREKA)₃-tTF fusion protein

图 3 (CREKA)₃-tTF 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

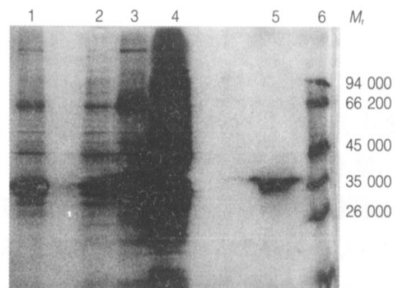
Fig.3 Analysis of expression of (CREKA)₃-tTF fusion protein by SDS-PAGE



1-10. IPTG 终浓度分别为 0,0.1,0.2,0.3,0.5,0.7,0.9,1.1,1.3 和 1.5 mmol/L
1-10. Final concentrations of IPTG is 0,0.1,0.2,0.3,0.5,0.7,0.9,1.1,1.3 and 1.5 mmol/L respectively

图 4 不同浓度 IPTG 诱导含重组子 E. coli BL21 的表达

Fig.4 Expression of (CREKA)₃-tTF fusion protein with different concentrations of IPTG



1. 总蛋白; 2.2 mol/L 尿素洗脱液; 3. 总不溶性蛋白; 4. 总可溶性蛋白; 5. 纯化蛋白; 6. 蛋白标准
1. Total express protein; 2.2 mol/L Urea wash buffer; 3. Total insoluble protein; 4. Total soluble protein; 5. Purified protein; 6. Marker

图 5 纯化 (CREKA)₃-tTF 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 Analysis of purified fusion proteins (CREKA)₃-tTF by SDS-PAGE

2.5 (CREKA)₃-tTF 的体外活性鉴定

室温下从加入 CaCl₂ 到血浆开始出现不流动时的时间,见表 1。经柠檬酸钠处理过后的血浆在仅加 12.5 mmol/L Ca²⁺ 或 6 μmol/L tTF、(CREKA)₃-tTF 时 30 min 内基本不凝;而在有 Ca²⁺ (12.5 mmol/L) 存在时,tTF、(CREKA)₃-tTF 均能有效的促进血浆凝固,且随蛋白浓度的增加凝血时间缩短(见表 1)。

表 1 (CREKA)₃-tTF 融合蛋白的体外凝血

Tab. 1 (CREKA)₃-tTF clotted *in vitro*

浓度		t/min	
蛋白质 / (μmol/L)	CaCl ₂ / (mmol/L)	tTF	(CREKA) ₃ -tTF
0	0	> 30	> 30
0	12.5	> 30	> 30
0.75	12.5	> 30	> 30
1.5	12.5	14.3 ± 2.1	12.2 ± 2.5
3	12.5	13.6 ± 1.9	10.5 ± 1.3
6	12.5	12.7 ± 2.4	8.6 ± 1.5
6	0	> 30	> 30

2.6 (CREKA)₃-tTF 与凝血血浆蛋白结合能力的荧光定量测定

通过 Scion image 软件对 tTF 和 (CREKA)₃-tTF 荧光图片进行光密度 (integrated optical density, IOD) 分析,结果表明对照组 tTF 只有微弱的荧光强度,而融合蛋白 (CREKA)₃-tTF 的荧光密度强度要高出对照组 tTF 约 12.5 倍。表明融合蛋白 (CREKA)₃-tTF 的 CREKA 可与凝血血浆蛋白结合。

3 讨论

在选择性肿瘤血管靶向治疗的策略中,载体是影响其疗效的主要因素之一,我们选用的是 CREKA 小分子肽作为载体介导 tTF。CREKA 小分子肽段作为 tTF 的载体具有两个优点:一是因为小分子肽的 M_r 小,不像抗体一样有较大的 M_r,有庞大的空间结构,有可能存在影响 tTF 凝血活性的构型。CREKA 不但是一个只有 5 个氨基酸的短肽,而且是直线形。相对来说,小分子 CREKA 对 tTF 凝血活性构型的影响小。另一方面,CREKA 能够特异结合凝血血浆蛋白,并且定位至肿瘤血管中,具有良好的靶向作用。

本研究利用 PCR 技术构建 CREKA/tTF 融合基因,重组载体测序结果完全正确,并成功表达于 *E. coli* BL21。通过优化 IPTG 浓度表达条件,实现目的蛋白 (CREKA)₃-tTF 在 *E. coli* BL21 中高效表达。在体外实验中,凝血实验的结果表明了融合蛋白 (CREKA)₃-tTF 保留 tTF 的促进血液凝固的活性。荧光定量测定实验证明了融合蛋白 (CREKA)₃-tTF 具有与凝血血浆蛋白结合的能力。表明 (CREKA)₃-tTF 融合蛋白中的 CREKA 保持了原有与凝血血浆蛋白结合的活性。

总之,我们通过基因技术成功构建表达了一种新型的肿瘤血管靶向性血栓蛋白 (CREKA)₃-tTF,这为进一步研究其体内选择性诱发肿瘤组织血管栓塞的活性和抗肿瘤作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Woglom W H. A critique of tumour resistance [J]. *Cancer Res*, 1923, 7:283-311.
- [2] Huang X, Molema G, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature [J]. *Science*, 1997, 275 (5299) :547-550.
- [3] Ran S, Gao B, Duffy S, et al. Infarction of solid Hodgkin s tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (20) :4646-4653.
- [4] Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, et al. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumor in mice [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (2) : 711-716.
- [5] Liu C, Huang H, Dofate F, et al. Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (19) : 5470-5475.
- [6] Dvorak H F, Senger D R, Dvorak A M, et al. Regulation of extravascular coagulation by microvascular permeability [J]. *Science*, 1985, 227: 1059-1061.
- [7] Simberg D, Duza T, Park J H, et al. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors [J]. *PNAS*, 2007, 104 (3) :932-936.
- [8] Hffiman J A, Graudo E, Singh M, et al. Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4 :383-391.
- [9] Scholz T, Temmler U, Krause S, et al. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P [J]. *Thromb Haemost*, 2002, 88 (6) :1033-1038.